第 28 卷 第 3 期 昆虫学报 Vol. 28, No. 3
1985 年 8 月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Aug., 1985

# 昆虫神经毒素的研究:DDT 对美洲蜚蠊 L-酪氨酸脱羧酶的诱导作用

罗 远 倪逸声 张宗炳
(北京大学生物系)

**摘要** 本文选择美洲蜚蠊 *Periplaneta americana* 作为材料，采用放射性同位素标记及放射自显影技术，观察 DDT 中毒蜚蠊体内 L-酪氨酸脱羧酶的变化,结果表明，DDT 具有诱导酪氨酸脱羧酶活性的作用。用加入放线菌素-D 及环已亚胺的方法,证明诱导控制在转录水平。还发现,这一诱导作用伴随着血淋巴中 cAMP 量的增加。根据 DDT 的诱导效应只在活体内发生,离体情况下不发生这种情况，以及连续的电刺激也可诱导毒素产生等现象,作者等提出 DDT 的物理诱导假说。

**关键词** 昆虫神经毒素 酪胺 美洲蜚蠊 酪氨酸脱羧酶 环腺苷酸

## 前 言

在前一篇论文(张宗炳等，1983)中,我们报道了在美洲蜚蠊 *Periplaneta americana* 血淋巴中因 DDT 中毒后产生的一种神经毒素,经鉴定结果认为是酪胺，或主要是酪胺(可能有部分苯乙胺)。本文报道这一毒素产生的机制,从生理反应估计，酪胺是由酪氨酸脱羧形成,因此研究了蜚蠊体内的酪氨酸脱羧酶,以及 DDT 对此酶的诱导机制。

## 材 料 与 方 法

### 一、试验昆虫

试虫是在 25℃ 恒温培养箱内饲养的美洲蜚蠊成虫。

### 二、DDT 处理

每 20 只成虫为一组,分别点滴 4μlp, p'-DDT 丙酮溶液 (100μg/10μl) 于前胸背板，另 20 只作为对照组。张宗炳等(1983)已证明丙酮不能引起神经毒素的产生，点药后,立即放入 30℃ 恒温培养箱中,12 小时后转移至 15℃ 中,经 0.5 小时以液氮固定待用。

另组在用 DDT 处理前,将放线菌素-D 及环已亚胺分别注入昆虫腹腔，然后按上述步骤进行 DDT 处理。

### 三、试样和匀浆制备

制备了血淋巴试样及神经索匀浆。用离心方法提取血淋巴液，再以 1:1 比例与抗坏血酸制成试样。

神经索 首先在冰浴中取出胸腹部神经索，加少量蔗糖液于玻璃匀浆器中匀浆。

### 四、酪氨酸脱羧酶活性的测定

本文于 1983 年 7 月收到。

参照 Murdock 和 Wirtz (1973) 及 Hopkins 和 Murdock (1976) 的方法并加修改。用标记的底物与酶反应,后用薄膜层析及液体闪烁计数测定生成的产物,作为酶活力。

取上述提取液(血淋巴或神经)样品 100μl, 按次加入 Tris 缓冲液、5-磷酸吡哆醛、抗坏血酸,然后将各管充氮气 3 分钟,最后加入标记的底物 $^3$H-3.5-酪氨酸 (总强度为 10 μCi, 43Ci/mmol), 以后保温,反应液的总体积为 0.4ml。酶的反应在 37℃ 进行 12 小时,反应后的混合物选用微晶型纤维素膜(20 × 20cm)进行薄膜层析,分离 $^3$H-酪胺。层析系统为: 正丁醇:甲醇:1*N* 甲酸 (V/V60:20:20)。层析后以 0.5% 茚三酮显色,再参照标准酪胺的斑点,将样品中的相应点剪下,置于盛有 10 μl 闪烁液的计数瓶中 (闪烁液组成: ppo 4 克, popop 0.1 克,甲苯 1,000 ml) 在 Packard 460 CD 型液体闪烁计数仪上进行测定。

酶的匀浆液经 Folin 酚方法测定总蛋白含量,酶活力表示为: 每毫克蛋白,每小时的计数 (cpm/hr/mg. 蛋白)。

放射自显影观察,将层析后的纤维素膜与乳胶片对贴,扎紧,放入干冷的冰箱中曝光,曝光后将乳胶片分开,并行显影、定影、制成放射自显片。

**五、以蛋白结合法测定血淋巴中 cAMP 含量**

用蛋白结合法测 cAMP,是根据蛋白激酶与标记的及非标记的 cAMP 产生竞争结合的原理。当反应系统中激酶与 $^3$H-cAMP 的量一定时,通过测定 $^3$H-cAMP 激酶的复合物,可求得样品中非标记的 cAMP 的含量。

标记的 cAMP (式样品) 先后加入 $^3$H-cAMP 与蛋白激酶,放置于 0—4℃ 反应 4 小时,反应后加入吸附剂并离心 (3,000 转/分,6 分钟),分离混合物中欲测的 $^3$H-cAMP-激酶,离心后取 200μl 置于计数瓶,加入闪烁液测放射性。

由各管计数求得结合率 ($C_O/C_X$, $C_O$—无标准 cAMP 和样品的计数; $C_X$—加入标准 cAMP 和样品后的计数)。以 $C_O/C_X$ 对标准 cAMP 的含量 (pmol) 作出标准曲线,未知样品则通过测定结合率,在标准曲线上查得相应的 cAMP 含量,经 Folin 酚测定蛋白含量,换算为: cAMP(pmol)/mg 蛋白。

**六、酪氨酸脱羧酶的初步分离纯化**

上述提取的血淋巴液经低温离心(10,000 转/分),做成上柱样品,选用 Sepharose-6B (1×70cm) 进行层析分离。用 0.1M, pH7.4 磷酸缓冲液洗脱,洗脱以 LKB 紫外监测仪记录,分出的峰分别收集,并经浓缩后,按方法四测定各峰的酪氨酸脱羧酶活性。

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析活性峰的蛋白成分。

## 结　果

**一、酪氨酸脱羧酶的活性**

薄膜层析法的结果表示,大部分标记的底物 $^3$H-酪氨酸已转化为 $^3$H-酪胺,换算为酶的活性 (cpm/hr/mg 蛋白) 如表 1 所示。正常情况下酪氨酸脱羧酶在蜚蠊血淋巴及神经索中均存在, DDT 处理后,酪氨酸脱羧酶增多,约提高一倍左右。

不同作用时间的酶活力曲线,是将 DDT 处理后的昆虫放入 35℃, 12 小时后转入 15℃,开始计时,分别在 0、0.5、1.0、2.5、5.0 小时以液氮固定。然后测酶的活性,以酶活力

表 1　DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用

Table 1　DDT induction of tyrosine decarboxylase

| 酶　原<br>Enzyme source | 酪氨酸脱羧酶活性<br>Activity of tyrosine decarboxylase | | |
|---|---|---|---|
| | 对　照<br>control | DDT 处理<br>DDT treated | 倍　数<br>ratio (induction effect) |
| 血淋巴<br>Haemolymph | 26.4±3.2 | 49.2±8.8 | 1.86 |
| 神经索<br>nerve cord | 35.1±10.4 | 65.6±2.4 | 1.87 |

对 DDT 作用时间作图，绘出 DDT 不同作用时间的酶活力曲线(图 1)。图 1 表明，DDT 的作用时间不同，对酪氨酸脱羧酶的诱导也不同，在 DDT 作用后 1—1.5 小时，诱导作用最为显著。

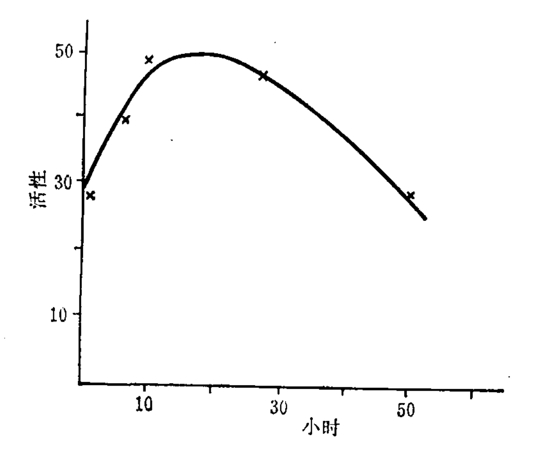



图 1　DDT 不同作用时间的酪氨酸脱羧酶活力

Figure 1　Tyrosine decarboxylase activity at different times after DDT treatment

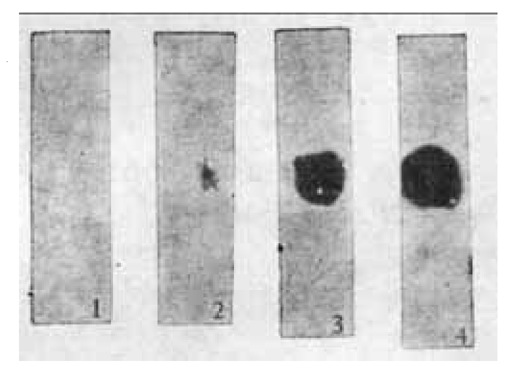



图 2　$^3$H 酪胺的放射自显影

1. 标准酪胺　2. 对照　3. DDT 处理(保温 8 小时)　4. DDT 处理(保温十小时)

Figure 2　Autoradiograph of $^3$H tyramine

1. tyramine sample,　2. control　3. DDT treated (8 hours incubation)　4. DDT treated (10 hours incubation)

对层析后的纤维素膜进行放射自显影观察，以显示标记的产物 $^3$H 酪胺的位置及放射活性。图 2 表明，匀浆中存在的酪氨酸脱羧酶已将标记的底物 $^3$H-酪氨酸转化为酪胺。根据 $^3$H 酪胺的放射活性不同可看出，DDT 处理后，$^3$H 酪胺的量在增加，即酪氨酸脱羧酶的活性提高。

二、DDT 的诱导水平

加入 mRNA 及蛋白质合成的抑制剂，观察 DDT 的诱导水平。在用 DDT 进行处理前，加入放线菌素-D(0.1$\mu$g/虫)，然后观察 DDT 的诱导效应(表 2)。结果表明，加抑制剂后，DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导效应消失。可见 DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用是控制在转录水平上的，与合成新的 mRNA 及蛋白质有关。

表 2　对酪氨酸脱羧酶 DDT 诱导水平

Table 2　Tyrosine decarboxylase induction level of DDT

| 酶　原 Enzyme source | 酪氨酸脱羧酶活性 Activity of tyrosine decarboxylase | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 对　照 control | DDT 处理 DDT treated | DDT 处理加放线菌素 D. DDT treated +actinomysin | DDT 处理加环己亚胺 DDT treated+ cycloheximide |
| 血淋巴 Haemolymph | 22±2.4 | 38.4±5.3 | 22.3±3.4 | 60.4±3.5 |
| 神经索 Nerve cord | 40.2±9.3 | 74.8±2.5 | 11.7±2.1 | 197±25.3 |

三、DDT 处理及对照组酪氨酸脱羧酶的米氏常数（$K_m$）值的比较。

参照 Murdock 和 Wirtz（1973）及 Bulger 和 Kupfer（1978）的工作，测定酪氨酸脱羧酶的米氏常数和最大速度，将 DDT 处理组及对照组的酶匀浆液，分别与不同浓度的底物，$^3$H 酪氨酸，保温测定酪氨酸脱羧酶的活力，并用双倒数法作出两条动力学曲线，如图 3。图 3 的结果表明，DDT 处理组与对照组样品相比，酶的 $K_m$ 值不变，但 $V_{max}$ 有改变，此结果进一步说明，DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用，不是改变酶的结构，而是合成了新蛋白质，使酶的量增加。

四、DDT 诱导作用的体内、体外实验

体内实验步骤同前，用 DDT 处理昆虫后，制备酶匀浆并测定酶的活性。体外实验是将未用 DDT 处理的酶匀浆，保温前加入相应量的 DDT，反应后测酶的活性。两种处理方法测定的酶活力进行比较（如表 3），结果表明，DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用只在体内条件下发生，在离体情况下不出现这种效应，可能与细胞膜的完整性，以及膜上的受体有关。

表 3　DDT 诱导作用在体内及体外的比较

Table 3　DDT induction in vivo vs. in vitro

| 处理方法 treatment | 酪氨酸脱羧酶活性 activity of tyrosine decarboxylase |
|---|---|
| 对　照 control | 78.9 |
| DDT 处理体内 +DDT in vivo | 153.5 |
| DDT 处理体外 +DDT in vitro | 81.9 |

注：表中为一次结果的数据，得到两次结果，但差异较大，未做平均，但两次的趋势是一致的。

五、DDT 处理后血淋巴中 cAMP 的变化

采用蛋白结合测定法测定 cAMP 含量，其结果见图 4 及表 4。从六次测试结果来看，DDT 处理后，cAMP 含量有较为明显的增加趋势，约增加 1—1.5 倍左右。这六次结果差异也较大，但总的趋势都一致，说明试验条件可能未控制好。就总的看来，cAMP 的增加是肯定的，这一结果与 DDT 处理后，酪氨酸脱羧酶活性的增高是相应的。

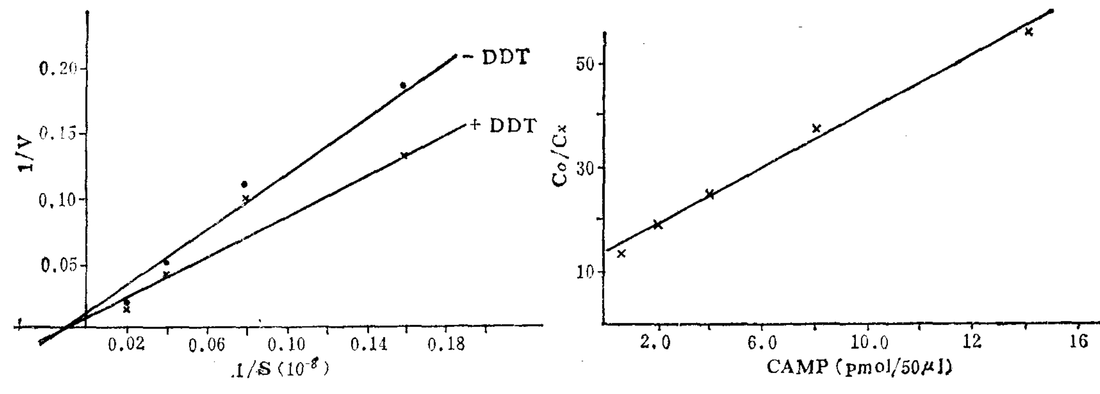



图 3　显示酪氨酸脱羧酶 $K_m$ 及 $V_{max}$ 的双倒数曲线(处理组及对照比较)

Figure 3　Double reciprocal curve showing $K_m$ and $V_{max}$ of tyrosine decarboxylase from normal and DDT-treated cockroaches.

图 4　cAMP 的标准曲线

Figure 4　Standard curve for cAMP

**表 4　DDT 处理后 cAMP 的改变**

Table 4　Changes of cAMP after DDT treatment

| 实验次数 Experiment | cAMP (p mol/mg protein) | | |
|---|---|---|---|
| | 对照 −DDT | DDT 处理 +DDT | 倍数 ratio |
| 1 | 2.17 | 3.26 | 1.50 |
| 2 | 1.42 | 2.58 | 1.82 |
| 3 | 1.52 | 2.33 | 1.53 |
| 4 | 1.07 | 1.66 | 1.55 |
| 5 | 0.62 | 1.60 | 2.58 |
| 6 | 0.62 | 1.29 | 2.08 |
| average | 1.15±0.5 | 2.01±0.6 | 1.75 |




图 5　Sepharose 6B 分离酪氨酸脱羧酶的各峰

Figure 5　Isolation of tyrosine decarboxylase by Sepharose 6B, showing three peaks

## 六、酪氨酸脱羧酶的初步分离、纯化和鉴定

采用 Sepharose-6B 对提取的酶匀浆进行柱层析，分离出三个主要的峰（图 5)。收集各峰管，分别测定酪氨酸脱羧酶的活力(表 5)。测定结果是，仅第三峰有酪氨酸脱羧酶活

力，同时得出，经此方法一次提纯后，酶的活力提高约 9.95 倍。

表 5 层析后各峰的酪氨酸脱羧酶的活性

Table 5 Activity of tyrosine decarboxylase of the three peaks after isolation

| 峰<br>Peak | 酪氨酸脱羧酶活性<br>Activity of tyrosine decarboxylase<br>(cpm/hr/mg protein) | 提纯倍数<br>Purification (times) |
|---|---|---|
| 层析前<br>Before isolation | 29.5 | |
| 峰 I<br>Peak I | 61.7 | |
| 峰 II<br>Peak II | 67.8 | |
| 峰 III<br>Peak III | 292.8 | 9.95 |

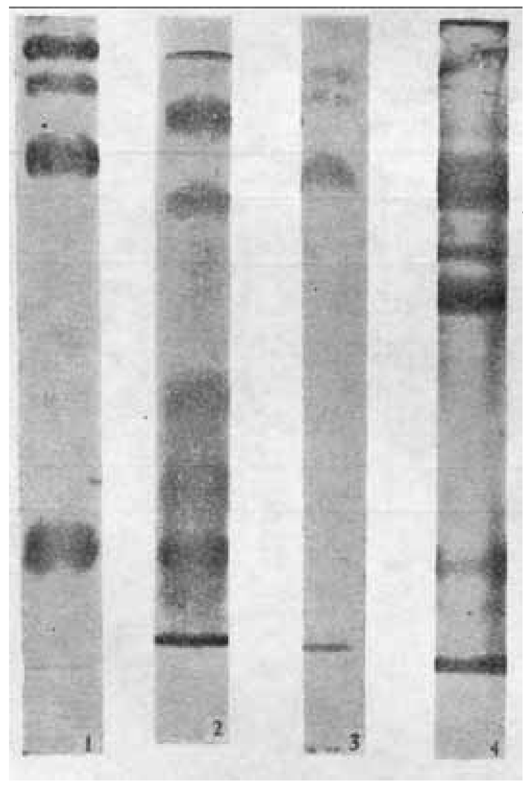



图 6 层析各峰样品的蛋白质丙酰烯胺凝胶电泳
1.峰 I 2.峰 II 3.峰 III 4.层析前

Figure 6 Polyacrylamide gel electrophoresis of the enzyme proteins of the three peaks
1. Peak I 2 Peak II 3 Peak III 4. Before isolation

用各峰蛋白作凝胶电泳进行鉴定时，得电泳图谱如图 6。

活性峰（III）仍有三条带，说明尚有待进一步提纯。

## 讨 论

### 一、DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用

继 Sternburg 等(1952，1964)发现神经毒素并推测其可能的化学结构后，张宗炳等(1983)提出了酪胺是这一神经毒素，他们采用 HPLC 法观察到，正常蜚蠊的血淋巴中也含有少量酪胺，用 DDT 处理后，酪胺的量增加，这一变化显然是由 DDT 诱导产生，但 DDT 是否能诱导酪氨酸脱羧酶的活力，是本文要解决的问题。

放射自显影及液体闪烁测定法都表明，在正常情况下，蜚蠊体内可以产生酪胺，用 DDT 处理后，则酪胺含量增加；其转化途径是通过酪氨酸脱羧酶将酪氨酸脱羧形成酪胺，这一结果与张宗炳等用 HPLC 法所得的结果一致。

实验发现，神经索中酪氨酸脱羧酶的活力高于血淋巴中的酶的活力。酪胺对于神经系统的作用已经肯定，神经毒素能引起昆虫的中毒症状及酪胺的神经电生理实验都证明，酪胺干扰了神经系统的正常功能。至于酪胺对神经系统的作用方式，Evans(1978) 曾提

出，酪胺是蜚蠊中枢神经系统"章鱼胺能突触"吸取章鱼胺的最有效竞争性抑制剂，因此，酪胺的积累造成中枢神经系统对章鱼胺吸取的阻滞，引起神经传导受阻而使昆虫死亡。

DDT 对酪氨酸脱羧酶产生的诱导作用，进一步为酪胺作为神经毒素提供了依据，同时，提出了 DDT 对昆虫体内一个新的酶系的诱导作用。

二、DDT 的诱导机制

为了阐明 DDT 的诱导水平，我们参照 Bulger 和 Kupfer (1978a，b) 的工作，在 DDT 处理前加入放线菌素-D 进行试验，结果发现，DDT 的诱导作用即消失(表 2)，说明 DDT 对酪氨酸脱羧酶产生的诱导效应，是在 DNA-mRNA 的转录水平上进行的；因而可影响蛋白质的合成和提高酶的活性，加入环己亚胺，诱导效应依然出现，这一现象目前尚无法解释。由于诱导作用可能是引起新的酶合成，为此，我们测定了 DDT 处理组及对照组的脱羧酶的 $K_m$ 值及 $V_{max}$ 值，由图 3 可见，二者的 $K_m$ 值相同，而 $V_{max}$ 不同，可见，DDT 这一诱导效应是通过增加酶的量来提高活力的。

DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导效应只在体内条件下发生，离体情况下(神经索匀浆)不发生，这可能与细胞膜的整体及膜的受体有关。进一步的研系表明，用 DDT 处理后，血淋巴中 cAMP 的含量增加，并与 DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导效应相平行，因此认为，DDT 对酪氨酸脱羧酶的诱导作用可能与 cAMP 有关，cAMP 作为第二信使，解除了对 DNA 的抑制，从而可合成更多的 mRNA 及蛋白质，提高了酪氨酸脱羧酶的活力。

三、DDT 的物理诱导假说

DDT 诱导产生神经毒素有以下几个事实：(1)诱导作用只发生在体内，离体情况下不发生，可见诱导效应依赖于细胞的完整性；(2) 六种不同类型的神经毒剂，只有引起神经高度兴奋的三种杀虫药剂(DDT，BHC 及溴氰菊酯) 可以引起神经毒素的产生 (张宗炳等，1984)；(3) 连续的电刺激也可诱导毒素的产生 (Sternburg，1952)。因此，我们认为，DDT 诱导酪氨酸脱羧酶的真正原因可能是物理性的，即物理刺激是真正的诱导剂。

关于酶的物理诱导，目前虽然尚未有人提出。但是，可以想象到，细胞膜上存在的一些受体或离子载体，受到一定的物理因素的作用，如电刺激 (以及 DDT 的直接或间接的作用)等，可能改变细胞膜的电性质(膜电位)及通透性，然后引起膜上受体或离子载体的结构改变，转而影响膜上的腺苷酸环化酶，产生 cAMP，导致对酪氨酸脱羧酶的诱导作用。尽管这仅是一种假说，尚待进一步证实，但从中也可得到一些有益的启示。由于 DDT 对多种酶都表现有诱导作用 (Bulger 和 Kupfer，1978a，b; Kacew 等，1973; Lamartiniere，1982; Hayaoka 等，1982)，因此，DDT 的物理诱导是可能的。

关于酪胺的进一步代谢问题。在哺乳动物及昆虫中已被发现，酪胺可被 $\beta$-羟化酶及单胺氧化酶所降解 (Hempel 等，1966)。进一步弄清酪胺的代谢途径，将有助于对酪胺作为神经毒素所起的作用作出比较完善的了解，这部分工作正在进行中。

## 参　考　文　献

张宗炳、吴士雄、金恒亮 1983 DDT 中毒昆虫释放的神经毒素的鉴定。科学通报 **28** (4)：256。
张宗炳、吴士雄、程念胜、姚逸红 1984 昆虫神经毒素的研究：各种神经毒剂引起毒素的产生。昆虫学报 **27** (2)：165—72。

Bulger, W. H. and D. Kupfer. 1978a Studies on the induction of rat uterine ODC by DDT analogs I. Comparison with Estradiol-17 activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 8: 253—62.
Bulger, W. H. and D. Kupfer. 1978b Studies on the induction of rat uterine ODC by DDT analogs II. Kinetic characteristics of ODC induced by DDT analogs and Estradiol. *Pestic. Biochem. Physiol.* 8: 262.
Evans, P. D. 1978 Octopamine: A high-affinity uptake mechanism in the nervous system of the cockroach. *J. Neurochem.* **30:** 1015—22.
Hayaoka, T. and W. C. Dauterman, 1982. Induction of glutathione S-transferase by phenobarbital and pesticides in various housefly and its effect on toxicity. *Pestic. Biochem. Physiol.* **17**: 113—119.
Hempel, K. and H. F. K. Maennl, 1966 Formation of tyramine-$^3$H from tyrosine-$^3$H in various chicken and cat tisses *in vivo. Arch. Pharmakol. exptl pathol.* **254**(5): 448—60.
Hopkins, T. L. and L. L. Murdock, 1976 Dopa and tyrosine decatboxylase activity in tissues of cockroach in relation to cuticle formatioon and ecdysis. *J. Insect. Physiol.* 22: 1167—71.
Kacew, S. and R. L. Singhal, 1973 The influence of p,p'-DDT etc., on hepatic and renal carbohydrate matabolism and cyclic AMP-adenyl system. Life Sci. 13: 1363—71.
Lamartiniere, C. A. 1982 Altered imprinting rat liver MAO by O.P'-DDT and methoxychlor. *Biochem Pharma.* 31(5): 647—51.
Murdock, L. L. and R. A. Wirtz, 1973 Dopa decarboxylase activity in arthropod nervous system. *Biochem. J.* 132: 681—8.
Sternburg, J. and C. W. Kearns, 1952 The presence of toxin other than DDT in the blood of DDT-poesoned roach. *Science* 116: 144—7.
Sternburg, J. 1964 Some chemical characteristics of a DDT-induced neuroactive substance from cockroaches and crayfish. *J. Econ. Entoml.* **57**(2):241.

# STUDIES ON INSECT NEUROTOXIN: DDT INDUCTION OF TYROSINE DECARBOXYLASE IN THE AMERICAN COCKROACH

Luo Yuan Ni Yi-sheng J. T. Chang*
*(Department of Biology, Beijing University)*

It was previously reported that the neurotoxin released by DDT prostrate cockroaches (*Periplaneta americana*) was identified to be tyramine. Presumably tyramine originates from decarboxylation of tyrosine. The induction of tyrosine decarboxylases by DDT was confirmed in the present work, using $^3$H-tyrosine, incubated with heamolymph or nerve cord homogenates respectively and determined by liquid scintillation and autoradiography. The induction by DDT is controlled at transcriptional level, since injection of Actinomycin-D prior to DDT treatment completely abolishes the induction effect. The induction of tyrosine decarboxylase is accompanied with an increase of cAMP. However, induction only occurs in vivo, not in vitro. Based on the fact that continuous electrical stimulation also induces the production of the neurotoxin and the result of present observations, a theory of the physical induction of enzyme was hereby proposed.

**Key words** neurotoxin——tyrosamine——*Periplaneta americana*——tyrosine decarboxylase——cAMP

---

* Please correspond with the senior author, J. T. Chang for reprints.